

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT IM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. Juli 2004 (08.07.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/057022 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

STANZEL, Manfred [DE/DE]; Taunusstr. 100, 91056 Erlangen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/004136

(74) Gemeinsamer Vertreter: SIEMENS AKTIENGESellschaft; Postfach 22 16 34, 80506 München (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. Dezember 2003 (15.12.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): CA, JP, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(30) Angaben zur Priorität:
102 59 819.3 19. Dezember 2002 (19.12.2002) DE

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): SIEMENS AKTIENGESellschaft [DE/DE]; Wittelsbacherplatz 2, 80333 München (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GUMBRECHT, Walter [DE/DE]; In der Röte 1, 91074 Herzogenaurach (DE).

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR PCR-AMPLIFICATION AND DETECTION OF NUCLEOTIDE SEQUENCES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR PCR-AMPLIFIKATION UND DETEKTION VON NUCLEOTIDSEQUENZEN

(57) Abstract: The invention relates to a DNA-Chip comprising a flat carrier and an array of spots containing probe molecules (oligonucleotides) which are arranged on said carrier. Each spot is associated with a microelectrode arrangement for impedance spectroscopic detection of binding events occurring between the probe molecules and target molecules (DNA fragments) applied by means of an analyte solution. In order to increase the sensitivity or the binding specific measuring effects of the biochip, the electrode arrangement is at least partially embedded in a hydrophilic reaction layer containing probe molecules and which is permeable to target molecules.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft einen DNA-Chip mit einem Flachträger und einem darauf angeordneten Array von Sondenmolekülen (Oligonukleotide) enthaltenden Spots, wobei jedem Spot eine Mikroelektroden-Anordnung zur Impedanzspektroskopischen Detektion von Bindungsereignissen zwischen den Sondenmolekülen und mittels einer Analytlösung applizierten Zielmolekülen (DNA-Fragmenten) zugeordnet ist. Zur Erhöhung der Sensitivität bzw. des bindungsspezifischen Messeffekts des Bio-Chips ist die Elektrodenanordnung zumindest teilweise in eine Sondenmoleküle enthaltende und für Zielmoleküle durchlässige hydrophile Reaktionsschicht eingebettet.

BEST AVAILABLE COPY

Beschreibung

Verfahren und Vorrichtung zur PCR-Amplifikation und Detektion von Nucleotidsequenzen

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur PCR-Amplifikation und Detektion von Nucleotidsequenzen. Ein solches Verfahren dient beispielsweise in der medizinischen Diagnostik dazu, infektiöse Zielsequenzen viraler oder bakterieller DNA aufzu-
spüren. Daneben bezieht sich die Erfindung auch auf eine zu-
gehörige Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

10

Während einer PCR (Polymerase Chain Reaction) wird die zu untersuchende Probe einer zyklischen Temperaturbehandlung unterzogen, bei der DNA-Fragmente im Wesentlichen mit Hilfe eines Primerpaares und einer Polymerase vervielfältigt werden. Heute stehen für solche Analysen Verfahren zur Verfügung, bei denen die PCR auf einem Microchip durchgeführt wird, der ein Array von als „Gel-Pads“ ausgebildeten Microspots aufweist
(WO 01/34842 A2). Um eine fluoreszenzspektroskopische Detektion von Hybridisierungen in den Microspots zu ermöglichen, wird bei den bekannten Verfahren der Analytlösung ein markierter Primer zugesetzt.

15

20

Vom Stand der Technik sind Verfahren zur Amplifikation und Detektion von Nukleinsäuren bekannt. Dabei können Gel-Pads als hydrophile Reaktionsschichten getrennte Microspots auf einem Mikroarray bilden, wobei in den Gel-Pads sich Oligonukleotide befinden, die mit zu identifizierenden Zielnukleinsäuren hybridisieren können. Weiterhin ist aus der Druckschrift „Nucleic Acids Res.“ (1999) 27 (18) e19, Seiten 1 bis 6, bekannt, Amplifikationsreaktionen in Gel-Pads auf einem Mikroarray und Nachweisreaktionen durch Einzelbasen-Elongation durchzuführen. Im Zusammenhang damit sind weiterhin die
DE 196 10 115 C2, in der ein Array mit einer Mikroelektrodenanordnung offenbart ist, und die WO 01/42508 A2, die Gel-Pads mit immobilisierten Sonden in Kontakt mit Mikroelektro-

30

35

den offenbart, anzuführen. Schließlich beinhaltet die
WO 99/36576 A1 die Verwendung von Gel-Pads in einem Array so-
wie Verfahren und Systeme zu deren Herstellung, wobei soge-
nannte intelligente Gele als Reaktionsschichten hergestellt
5 werden sollen.

Davon ausgehend ist es Aufgabe der Erfindung, ein verbesser-
tes Verfahren zur Amplifikation und Detektion von Nucleotid-
sequenzen vorzuschlagen, mit dem ein kontinuierliches Monito-
10 ring der PCR und insbesondere eine gleichzeitige Untersuchung
mehrerer Zielsequenzen oder mehrerer Mutationen einer Zielse-
quenz auf einfache Weise möglich ist. Daneben soll eine Vor-
richtung geschaffen werden, die insbesondere eine elektroche-
mische Messung ermöglicht.

15 Die Aufgabe wird durch die Verfahrensschritte gemäß Patentan-
spruch 1 gelöst. Eine zugehörige Vorrichtung ist Gegenstand
des Patentanspruches 11. Weiterbildungen sind in den jewei-
ligen abhängigen Ansprüchen angegeben.

20 Beim erfindungsgemäßen Verfahren wird folgendermaßen vorge-
gangen:

- 25 a) es wird ein Microchip mit einem Array von mehreren Analy-
sepositionen bildenden Microspots bereit gestellt, welche
jeweils eine hydrophile Reaktionsschicht und eine darin
eingebettete Mikroelektrodenanordnung umfassen, wobei die
Reaktionsschicht wenigstens ein immobilisiertes, mit einer
zu identifizierenden Zielsequenz eines DNA-Fragments
hybridisierbares Oligonucleotid als Sondenmolekül enthält,
- 30 b) eine mehrere Zielsequenzen und PCR-Reagenzien enthaltende
Analytlösung wird so auf den Microchip aufgebracht, dass
sie das Array vollständig überdeckt,
- c) zur Amplifikation der Zielsequenzen wird das Array einer
Thermozyklisierung unterworfen,
- 35 d) Hybridisierungsergebnisse an immobilisierten Sondenmole-
külen einer Analyseposition werden mit Hilfe der ihr zuge-
ordneten Mikroelektrodenanordnung detektiert.

Vorteilhaft bei diesem Verfahren ist zunächst, dass sich Bindungs- bzw. Hybridisierungsereignisse in einem Microspot ohne Unterbrechung der ablaufenden Reaktionszyklen und mit einem minimalen apparativen Aufwand von Beginn der PCR an detektieren lassen. Da sich in den Microspots voneinander unabhängige Elektrodenanordnungen befinden, ist jede Analyseposition einzeln adressierbar und somit mit einem bestimmten Sondenmolekül bzw. einer gesuchten Zielsequenz korrelierbar. Es kann daher eine Hybridisierung in einer Vielzahl von Microspots auf einfachste Weise gleichzeitig verfolgt werden. Bei optischer Auslesung hingegen wäre ein optisches Erfassungssystem erforderlich, das schon allein wegen der geringen Größe der Spots und deren Anordnung auf engstem Raum technisch aufwendig ist. Der technische Aufwand wird noch vergrößert, wenn Arrays mit einer großen Zahl von Microspots auszulesen sind.

Die in einem Microspot durch Hybridisierung mit immobilisierten Sondenmolekülen festgehaltenen Nucleotidsequenzen verändern aufgrund ihrer elektrischen Teilladungen elektrische Parameter wie beispielsweise den Leitwert innerhalb eines Microspots oder die Impedanz einer Elektrodenanordnung. Damit ist mit einer erfindungsgemäßen Vorrichtung aus einem Bio-Chip mit Mikroelektrodenanordnung eine elektrochemische bzw. elektrische Auswertung möglich.

Bei einem aus DE 196 10 115 C2 bekannten impedanzspektroskopisch auslesbaren Bio-Chip sind zwar bereits auf einem Träger mehrere interdigitale Elektrodenanordnungen vorhanden, wobei Sondenmoleküle auf den Elektroden und auf den zwischen den Elektroden angeordneten Flächen immobilisiert sind. Problematisch bei dieser Art der Detektion von Bindungsereignissen ist, dass sich die Abmessungen der Elektrodenstrukturen um Größenordnungen von molekularen Dimensionen unterscheiden. Mit noch vertretbarem technischen Aufwand lassen sich Elektroden mit einer Breite zwischen 1 und 10 μm , insbesondere von etwa 5 - 10 μm , mit einem ebensolchen Abstand und mit ei-

ner Dicke von etwa 0,1 bis 0,5 μm herstellen. Der impedanzspektroskopisch erfassbare Bereich des elektrischen Feldes einer solchen Elektrodenanordnung erstreckt sich etwa 5 bis 10 μm über die Trägeroberfläche bzw. die von der Elektrodenanordnung aufgespannte Ebene hinaus. Dagegen hat ein beispielsweise 100 Basenpaare aufweisendes Sondenmolekül eine Länge von nur etwa 30 nm, d.h. 0,3 μm . Entsprechend gering ist der Einfluss von Bindungsereignissen in einer auf der Sensorfläche bzw. den Elektroden immobilisierten monomolekularen Schicht von Sondenmolekülen auf das elektrische Feld bzw. auf die Impedanz der Elektrodenanordnung.

Dadurch, dass erfindungsgemäß die Elektrodenanordnung zumindest teilweise in eine Sondenmoleküle enthaltende und für Zielmoleküle durchlässige hydrophile Reaktionsschicht eingebettet ist, kann innerhalb der Reaktionsschicht eine viel größere Anzahl von Sondenmolekülen bzw. Zielsequenzen angesammelt werden als in einer monomolekularen Schicht. Die Folge ist eine weitaus größere Beeinflussung des elektrischen Feldes bzw. des impedanzspektroskopischen Erfassungsbereiches der Elektrodenanordnung. Ein derart ausgestalteter Bio-Chip weist eine entsprechend größere Messempfindlichkeit bzw. Sensitivität auf. Bei herkömmlichen Bio-Chips dagegen würde eine durch PCR erzielte Konzentrationserhöhung der Zielsequenzen aufgrund des geringen Angebots an Sondenmolekülen zu keiner Steigerung der Sensitivität führen.

Die bei einem erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Reaktionsschicht muss, um eine PCR durchzuführen, bis etwa 95°C thermisch stabil sein. Thermisch stabil soll dabei bedeuten, dass die Reaktionsschicht auch bei der angegebenen Temperatur derart beschaffen ist, dass sie Sondenmoleküle festhält, dass in ihr eine Hybridisierung/Denaturierung (Aufschmelzen) von Zielsequenzen und Sondenmolekülen ungehindert stattfinden kann und dass sie auch ihre sonstigen Eigenschaften im wesentlichen beibehält. Zur Immobilisierung enthält die Reaktionsschicht vorzugsweise Polymere mit Kopplungsgruppen, an die

Sondenmoleküle kovalent gebunden sind. Dadurch ist sicher gewährleistet, dass Bindungspaare aus Zielsequenzen und Sondenmolekülen bei Spülvorgängen im Anschluss an eine PCR in der Reaktionsschicht zurückgehalten werden.

5

Eine besonders geeignete Reaktionsschicht besteht aus einem Hydrogel. Hydrogele bilden ein wässriges Milieu in mechanisch stabiler Form, das einen Stoffaustausch mit einem überwiegend wässrigen Analyten erlaubt. Als besonders geeignet haben sich
10 radikalisch vernetzbare Hydrogele auf Acrylamidbasis mit Maleinsäureanhydrid und/oder Glycidyl(meth)acrylat als Koppelungsgruppen erwiesen.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst der
15 Flachträger des Bio-Chips als Substrat Silizium(Si) und eine damit verbundene Isolierschicht, wobei letztere auf ihrer der Siliziumschicht abgewandten Seite die Elektrodenanordnung und die Reaktionsschicht trägt. Bei einer solchen Anordnung lässt sich die elektrische Verschaltung der Elektrodenanordnung unter Verwendung der von Si-Speicherchips bekannten Technologie
20 verwirklichen.

Ein besonderer Vorteil des vorgeschlagenen Verfahrens besteht darin, dass es bei Simultan- bzw. Multiplexuntersuchungen eine größere Vielfalt an unterschiedlichen Gestaltungsmöglichkeiten erlaubt. Dies liegt u.a. daran, dass in während der
25 PCR entstandene Amplicons keine Markierung eingebaut werden muss, was vor allem bei komplexen Tests die Gefahr in sich birgt, dass es zwischen den zur Markierung erforderlichen
30 Stoffen und zwischen diesen und zu identifizierenden Zielsequenzen zu unerwünschten Wechselwirkungen kommt.

Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Figurenbeschreibung von Ausführungsbeispielen anhand der Zeichnung in Verbindung mit den Patentansprüchen. Es zeigen:
35

Fig. 1 eine vereinfachte perspektivische Darstellung eines einen Flachträger und ein Array von Microspots umfassenden Microchips,

5 Fig. 2 einen Querschnitt durch einen Spot entsprechend Linie II-II in Fig. 1, in vergrößerter ausschnittsweiser Darstellung,

Fig. 3 einen Ausschnitt einer einem Spot zugeordneten Elektrodenanordnung,

10 Fig. 4 eine Ausführungsform eines Microchips mit einer 4-poligen Elektrodenanordnung in einer Fig. 2 entsprechenden Darstellung,

Fig. 5 die Elektrodenanordnung des Microchips von Fig. 4 in einer Fig. 3 entsprechenden Darstellung,

15 Fig. 6 eine schematische Darstellung, die eine erste Verfahrensvariante einer PCR-gestützten Analyse verdeutlicht,

Fig. 7 eine die Wirkungsweise eines unspezifischen Primerpaares aufzeigende Schemazeichnung,

20 Fig. 8 eine schematische Darstellung einer Abwandlung der ersten Verfahrensvariante,

Fig. 9 eine schematische Darstellung einer zweiten Verfahrensvariante,

Fig. 10 eine schematische Darstellung einer dritten Verfahrensvariante

25

Wie Fig. 1 zeigt, umfasst ein als Bio-Chip 1 bezeichnetes Element einen Flachträger 2, auf dessen einer Seite ein Spot-Array 3 aufgebracht ist. Ein im folgenden mit Spot 4 bezeichneter Microspot enthält immobilisierte Sondenmoleküle, beispielsweise Oligonucleotide. Wird auf einen Spot 4 eine Analytlösung mit unbekannten Zielmolekülen aufgebracht, so kommt es bei entsprechender Übereinstimmung in der Basensequenz zu einer Ankopplung des Zielmoleküls an das Sondenmolekül. Die durch ein solches Bindungsereignis hervorgerufene Eigenschaftsänderung, z.B. Änderungen des spezifischen Widerstandes, der Impedanz oder der Dielektrizitätskonstante, kann mit einer Elektrodenanordnung 5 erfasst werden.

30

35

Vom Spot-Array 3 bzw. Mikrochip 1 mit darin implementierten Elektroden wird eine Vorrichtung gebildet, die ein Online-Monitoring zulässt. Eine solche Vorrichtung kann unterschiedlich ausgebildete Elektrodenanordnungen aufweisen, die in den Figuren 3 und 5 dargestellt sind. Die Figuren 2 und 4 zeigen dagegen die Phänomenologie der Immobilisierung und der Messung bei solchen Anordnungen.

Beim Ausführungsbeispiel von Fig. 2 ist eine zweipolige Elektrodenanordnung vorhanden. Diese ist beispielsweise mit Hilfe eines photolithographischen Verfahrens auf den Flachträger 2 aufgebracht. Die Elektrodenanordnung 5 umfasst zwei Elektroden 6, 7, die in Form einer Interdigitalstruktur ausgebildet sind. D.h. jede Elektrode umfasst mehrere streifenförmige parallel zueinander verlaufende Teilelektroden 6a, 7a, die sich jeweils in den Zwischenraum zweier Teilelektroden der jeweils anderen Elektrode hinein erstrecken. Die Teilelektroden 6a, 7a sind durch einen ebenfalls streifenförmigen, sich quer zu den Teilelektroden 6a, 7a streckenden Verbindungsleiter 6b, 7b miteinander verbunden. Die Elektroden 6, 7 sind mit einem hochfrequenten Wechselstrom im Megahertzbereich beaufschlagt. Die Breite 8 der Teilelektroden 6a, 7a beträgt ca. 1 μm , ihre Höhe 9 beträgt etwa 100 bis 500 nm. Zwischen den Teilelektroden 6a, 7a ist ein Abstand 10 von ebenfalls ca. 1 μm vorhanden.

Der Flachträger 2 umfasst eine Siliziumschicht 12 und eine zwischen dieser und den Elektroden 6, 7 angeordnete Isolierschicht 13 aus einem Polymer. Die für eine z.B. impedanzspektroskopische Messung von Bindungsereignissen erforderlichen elektrischen Verschaltungen und Bauteile sind in herkömmlicher Weise durch eine entsprechende Topologie der Siliziumschicht realisiert, was in Figur 2 nicht weiter dargestellt ist. Auf der Isolierschicht 13 ist eine Reaktionsschicht 14 aus einem Hydrogel aufgebracht, welches weiter unten näher beschrieben wird. Es kann zweckmäßig sein, den

Flachträger 2 bzw. die Siliziumschicht 13 im Bereich eines Spots mit einer Vertiefung zu versehen, welche mit der Reaktionsschicht 14 aufgefüllt ist (siehe Fig. 6, 8 - 10). In der Reaktionsschicht 14 bzw. dem Hydrogel sind Sondenmoleküle 15, was in Fig. 2 überdimensioniert und symbolisch dargestellt ist, eingebettet und homogen verteilt. Ein Sondenmolekül mit 300 Basen weist etwa eine Länge von 100 nm auf. Demzufolge hat eine unimolekulare Schicht von Sondenmolekülen bei herkömmlichen Microchips allenfalls etwa eine Dicke entsprechend der Linie 16 in Fig. 2. Es ist leicht einsehbar, dass eine solche Schicht relativ wenige Sondenmoleküle 15 aufnehmen und dementsprechend im Falle von Bindungs- bzw. Hybridisierungsereignissen das elektrische Feld der Elektrodenanordnung nur gering beeinflussen kann. Demgegenüber ist bei einem erfindungsgemäßen Microchip der Sondenmoleküle 15 enthaltende und von Feldlinien 17 durchdrungene Reaktionsbereich wesentlich erweitert und bietet Platz für eine um mehrere Zehnerpotenzen größere Anzahl von Sondenmolekülen 15. Wird auf ein solcher Art ausgestaltetes Spot-Array 3 bzw. auf einen Spot 4 eine Analytlösung 18 aufgebracht, so finden die darin enthaltenen Zielmoleküle 19 bzw. Zielsequenzen, die in Fig. 2 ebenfalls übertrieben groß und nur symbolisch dargestellt sind, eine wesentlich größere Anzahl möglicher Bindungspartner in Form der Sondenmoleküle 15 vor.

Die Reaktionsschicht 14 ist vorzugsweise so dimensioniert bzw. weist eine derartige Dicke, beispielsweise von 5 bis 10 μm , auf, dass der impedanzspektroskopische Erfassungsbereich praktisch vollständig ausgenutzt ist, was bei einer Dicke der Reaktionsschicht von etwa 5 bis 10 μm der Fall ist. Bei entsprechender Konzentration von Sondenmolekülen 15 in diesem Bereich kann somit der bindungsspezifische Messeffekt des Microchips wesentlich erhöht werden. Die Reaktionsschicht ist so beschaffen, dass sie ein wässriges Reaktionsmedium zur Verfügung stellt. Weiterhin ist sie so beschaffen, dass Zielmoleküle 19 oder auch andere für eine Reaktion benötigte Stoffe, beispielsweise Polymerase, in sie eindiffundieren

können, ohne dass dabei deren Reaktivität beeinträchtigt wird.

Wie schon oben erwähnt, wird erfindungsgemäß ein Hydrogel als
5 Reaktionsschicht 14 verwendet. Ein Hydrogel stellt ein wäss-
riges Milieu in mechanisch stabiler Form bei gleichzeitiger
Gewährleistung des Stoffaustausches in einer überwiegend
wässrigen Umgebung dar. Durch Wahl der chemischen Zusammen-
setzung, was die Komponenten und deren Verhältnis untereinander
10 betrifft, können die Eigenschaften der Hydrogele, wie
Wassergehalt, Quellverhalten, mechanische Stabilität, etc.,
über weite Bereiche variiert werden. Ein Hydrogel, das leicht
herstellbar ist, und das eine gute Haftung sowohl zur Elek-
trodenanordnung 5 als auch zur Isolierschicht 13 aufweist,
15 ist ein radikalisch vernetzbares Hydrogel auf Acrylamidbasis,
das ein Comonomer enthält, welches eine kovalente Ankopplung
entsprechend modifizierter Sondenmoleküle über Linkergruppen
ermöglicht. Das Hydrogel umfasst neben der Monomervorstufe
des Polyacrylamids ein Vernetzungsmittel, wenigstens einen
20 Radikalinitiator, wenigstens ein Comonomer mit reaktiven Lin-
kergruppen und gegebenenfalls wenigstens einen Weichmacher.
Nach Schichtherstellung und anschließender thermischer bzw.
Fotovernetzung wird ein mit Wasser quellbares Hydrogel erhal-
ten, das reaktive Linkergruppen zur Immobilisierung von Son-
25 denmolekülen enthält. Als Vernetzungsmittel werden Methylen-
bisacrylamid und/oder Dimethylacrylsäureester, beispielsweise
Tetraethylenglykoldimethacrylat, eingesetzt.

Durch die Variationen der Konzentrationen des Vernetzungsmit-
30 tels lässt sich die Maschenweite des Hydrogels einstellen.
Das verwendete Comonomer enthält Maleinsäureanhydrid und/oder
Glycidyl(meth)acrylat. Als Weichmacher eignet sich Mono-Di-
und/oder Triethylenglykol. Die genannten Ausgangsstoffe sind
mit einem polaren, mit Wasser mischbaren Lösungsmittel, vor-
35 zugsweise mit Dimethylformamid, vermengt. Durch Variation des
Lösungsmittelanteiles kann die Verarbeitungviskosität einge-
stellt werden. Die Haftung an der Flachträgeroberfläche sowie

an der Elektrodenanordnung 5 kann durch Beimengung üblicher Haftvermittler beispielsweise auf Silanbasis verstärkt werden.

5 In Fig. 4 und 5 ist eine vier-polare Elektrodenanordnung 20 dargestellt. Die Elektrodenanordnung 20 setzt sich aus zwei Stromelektroden 22, 23 und zwei Spannungs- bzw. Sondenelektroden 24, 25 zusammen. Die Stromelektroden 22, 23 sind entsprechend der Elektrodenanordnung 5 des Ausführungsbeispiels
10 nach Fig. 2 angeordnet und ausgestaltet. Die Sondenelektroden 24, 25 sind ebenfalls streifenförmig und erstrecken sich als mäanderförmiger Doppelstrang durch die zwischen den Teilelektroden 22a und 23a vorhandenen Zwischenräume hindurch. Die Stromelektroden 22, 23 sind mit einem hochfrequenten
15 Wechselstrom beaufschlagt. An den Sondenelektroden 24, 25 liegt ein Spannungsmesser 26 an, mit dem eine Veränderung des elektrischen Wechselfeldes in Folge von Hybridisierungsereignissen detektierbar ist. Die Messung kann somit unabhängig von den Stromelektroden erfolgen, so dass sich z.B. deren die
20 Elektrodenkapazität erhöhende Polarisierung nicht auf die Messung auswirken kann. Dagegen muss bei einer 2-poligen Elektrodenanordnung die Elektrodenkapazität durch eine entsprechend hohe, messtechnisch ungünstige Messfrequenz gering gehalten werden, um den für die Messung ausschlaggebenden Widerstand der Analytlösung bzw. der Reaktionsschicht bestimmen
25 zu können.

Bei einer in Fig. 6 (siehe hierzu und zu Fig. 8 bis 10 die weiter unten wiedergegebene Legende) schematisch aufgezeigten
30 Verfahrensvariante wird auf einen Microchip 1 eine Analyselösung 18 aufgebracht, die ein DNA-Fragment F_A mit einer Zielsequenz Z_A , ein externes Primerpaar sowie die für eine PCR erforderlichen Reagenzien, wie eine Taq-(DNA) Polymerase, dNTP's (Desoxynucleosidtriphosphate) etc. enthält. Bei der
35 Zielsequenz Z_A handelt es sich um eine solche, die in mehreren unterschiedlichen Varianten vorkommen kann, z.B. Typisierung von Viren, z.B. HIV oder HPV. Jeder möglichen Variante

(Z_{A1}, Z_{A2} usw.) ist mindestens ein eigener Spot 4A1, 4A2 usw. zugeordnet, wobei innerhalb der Reaktionsschicht 14 des jeweiligen Spots ein einziger Oligonucleotidtyp als Sondenmolekül immobilisiert ist, welcher mit einer spezifischen Zielsequenz hybridisieren kann. Die auf übliche Weise unter Anwendung einer Thermozyklisierung durchgeführte Amplifikation (PCR) der Zielsequenz Z_A erfolgt ausschließlich in der mobilen Phase 18. Vorzugsweise wird ein Primerpaar verwendet, das außerhalb der Zielsequenz Z_A ankoppelt (hybridisiert), wie in Fig. 7 angedeutet, ist. Der kopierte Doppelstrang, also der Strang S⁺ und der Gegenstrang S⁻ lösen sich beim Denaturieren (Aufschmelzen) voneinander. Üblicherweise wird der Strang S⁺ („sense“ Strang) zur Identifizierung einer Zielsequenz herangezogen. Dementsprechend sind in den Spots 4A1, 4A2 Oligonucleotide immobilisiert, die genau mit diesem Strang hybridisieren. Im einfachsten Fall der Anwesenheit nur eines DNA-Fragmentes Z_{A1} sammelt sich die amplifizierte Zielsequenz Z_{A1} durch Hybridisierung in jenem Spot an, in dem das entsprechend komplementäre Fängeroligonucleotid Z_{A1} immobilisiert ist.

Bei der in Fig. 8 angedeuteten Verfahrensvariante sind in der Analytlösung 18 verschiedenen Arten von DNA-Fragmenten vorhanden. Beispielfhaft sind zwei solcher DNA-Fragmente, F_A und F_B, gezeigt. Bei einem oder allen der in der Analytlösung 18 vorhandenen DNA-Fragment/en kann es sich um solche gemäß der Verfahrensvariante nach Fig. 6 handeln. In diesem Fall sind unterschiedliche Gruppen von Spots vorzusehen, wobei jeder Gruppe die Typisierung der Varianten eines DNA-Fragmentes zugeordnet ist. Ziel der analytischen Untersuchung können aber auch „völlig“ unterschiedliche DNA-Fragmente sein. In diesem Fall ist es prinzipiell ausreichend, einem DNA-Fragment F_A, F_B jeweils einen einzigen Analyse-Spot 4A, 4B zuzuordnen. Wie auch bei der Verfahrensvariante nach Fig. 6, ist hier in der Analytlösung 18 ein externes Primerpaar vorhanden. Dieses wird so ausgewählt, dass es für die Amplifikation aller zu

analysierenden DNA-Fragmente F_A , F_B geeignet ist („Multiplex PCR“).

Die bei Fig. 6 und Fig. 8 aufgezeigten Fänger-Oligonucleotide können in weiteren Verfahrensvarianten als Primer fungieren, falls sie durch DNA-Polymerasen verlängert werden können. Es findet dann, wenn die Reaktionsschicht 18 durchlässig für die DNA-Polymerase und das/die Template/s sowie die weiteren Komponenten der PCR-Reaktion ist, eine Elongation der immobilisierten Oligonucleotide entsprechend der Sequenz der hybridisierten Matrix statt.

Bei der in Fig. 9 angedeuteten Verfahrensvariante sind mehrere verschiedene DNA-Fragmente entsprechend den Verfahrensvarianten nach Fig. 6 oder nach Fig. 8 vorhanden. Beispielfhaft sind zwei solche DNA-Fragmente, F_A und F_B , gezeigt. Während bei den bisher beschriebenen Verfahrensvarianten der Analytlösung ein Primerpaar zugesetzt wurde, ist nunmehr nur ein Primer des Primerpaares mobil und gelöst in Lösung vorhanden. Dieser Primer ist unspezifisch, das heißt, es handelt sich um einen externen Primer, der bei sämtlichen in der Analytlösung vorhandenen DNA-Fragmenten F_A und F_B außerhalb der nachzuweisenden Zielsequenz Z_A und Z_B (vorzugsweise am „sense“ Strang) ankoppelt. Nach dem Denaturieren der Analytlösung diffundieren die DNA-Einzelstränge wahllos in die Spots ein. In diesen Spots sind spezifische direkt vor der Zielsequenz der Analyt-DNA bindende Oligonucleotidfänger immobilisiert. Nur dort, wo die Analyt-DNA auf komplementäre immobilisierte Oligonucleotide (Fänger) trifft, findet eine Hybridisierung statt. Im folgenden Elongationsschritt der PCR wird das 5'-Ende der Fänger-Oligonucleotide, die vorher selektiv die nachzuweisenden DNA-Fragmente eingefangen (gebunden) haben, entsprechend der Information der hybridisierten Matrize verlängert. Der Fänger wird damit zum Primer für die DNA-Polymerasereaktion.

Letzteres bedeutet, dass eine Elongation nur in einem solchen Microspot stattfinden kann, in dem auch der zur Zielsequenz

komplementäre Fänger vorhanden ist. Im Falle des Schemas in Fig. 9 heißt dies, dass der Strang S^+ des DNA-Fragmentes F_A im Spot 4A und der Strang S^+ des DNA-Fragmentes F_B im Spot 4B durch Elongation des jeweiligen immobilisierten Primers/Fängers kopiert wird. Beim nach dem jeweiligen Amplifikations-
schritt und dem Aufschmelzen folgenden Reannealing lagern sich die ursprünglich vorhandenen und die in der Lösung neu entstandenen Zielsequenzen an komplementäre Fänger bzw. Sequenzen an. Auf Grund der Erhöhung der Konzentration der Zielsequenz durch den vorhergehenden PCR-Zyklus werden diese Sequenzen auch an noch nicht verlängerte, in ihrer ursprünglichen Form vorhandene Fängeroligonucleotide binden, so dass der nächste PCR-Elongationsschritt an diesen, durch die Hybridisierung neu entstandenen Primern ansetzt. Dadurch steigt die Konzentration an verlängertem Fänger mit jedem PCR-Zyklus. Diese Erhöhung der Konzentration an, um etwa 100-300 Basen verlängertem Fänger/Primer (gegenüber ursprünglich 20-30 Basen), ruft eine elektrische Feld- oder Widerstandsänderung hervor, die mit Hilfe der Elektrodenanordnung 5 bzw. 20 gemessen und zum PCR-Monitoring („on-line“ PCR) genutzt werden kann.

Bei der Verfahrensvariante nach Fig. 10 sind in der Analytlösung 18 eine oder mehrere DNA-Fragmentspezies entsprechend den Verfahrensvarianten nach Fig. 6 oder Fig. 8 vorhanden. Während bei den Varianten nach Fig. 6 sowie Fig. 8 Primerpaare und bei der Variante nach Fig. 9 nur ein Primer des/der Primerpaares/Primerpaare der Analytlösung zugesetzt wurden, sind hier keine gelösten freien Primer in der Lösung vorhanden. Die Elongationsreaktionen finden hier in den einzelnen Microspots 4A, 4B etc. statt. Im Gegensatz zu allen anderen Verfahrensvariante werden hier (Fig. 10) beide für den spezifischen Nachweis beider DNA-Stränge der Zielsequenz notwendigen Fänger des Fängerpaar im jeweils gleichen Gelspot immobilisiert, d.h. ein immobilisiertes internes an eine Zielsequenz hybridisierendes Fänger/Primerpaar ist vorhanden. Nach dem Aufschmelzen (Denaturieren) der Probe diffundieren die

DNA-Einzelstränge wahllos in die Spots ein. Der Strang S_A^+ bzw. S_A^- hybridisiert mit seinem 5'- bzw. 3'- Ende an den komplementären Primer des Primerpaares im Spot 4A.

- 5 Gemäß Fig. 10 bindet am Spot 4A der S^+ -Strang des DNA-Fragments F_A an einen mit A^+ indizierten Primer sowie der S^- -Strang des DNA-Fragments F_A an einen mit A^- indizierten Primer. Es wird dann ein antiparalleler Strang S^- bzw. S^+ gebildet, der nun, da er durch Elongation des immobilisierten Primers A^+ bzw. A^- synthetisiert wurde, ebenfalls immobilisiert ist. Demgegenüber ist das 3'-Ende des elongierten Stranges S^- bzw. S^+ frei beweglich und kann mit einem in seiner Nähe in der Reaktionsschicht immobilisierten Gegen-Primer A^- bzw. A^+ hybridisieren. Beim folgenden Amplifikationsschritt ergibt sich daraus ein S^+ - bzw. S^- -Strang, der, da er durch Elongation des immobilisierten Primers A^+ bzw. A^- gebildet wurde, ebenfalls immobilisiert ist.

- 20 Die bei jedem PCR-Zyklus auftretende Erhöhung der Konzentration an entsprechend verlängerten Fängern ruft, wie bereits weiter oben beschrieben, eine elektrische Feld- oder Widerstandsänderung hervor, die mit Hilfe der Elektrodenanordnung 5 bzw. 20 zum PCR-Monitoring genutzt werden kann. Damit ist eine on-line PCR möglich.

- 25 Für das neue, vorstehend im Einzelnen erläuterte Verfahren zur Amplifikation und Detektion von Nucleotidsequenzen wird ein Bio-Chip verwendet, wie er in den Figuren 2 und 4 in den Alternativen als Zwei-Pol- oder Vier-Pol-Anordnung beschrieben ist.

- 30 Speziell aus den Figuren 2 und 4 ist ersichtlich, dass der für das angegebene Verfahren geeignete Bio-Chip einschließlich der darauf angeordneten Reaktionsschicht und der damit in Kontakt befindlichen Analytlösung in einem in diesen Figuren als Rahmen dargestellten Gehäuse angeordnet ist. Entsprechend den Figuren 6 sowie 8 bis 10 ist das Gehäuse seitlich

15

offen, so dass die Analytlösung im Durchfluss an der Reaktionsschicht vorbeiströmen kann.

Legende der Symbole in der vorstehenden Beschreibung und den Figuren:

- ↑ = Primer, in Lösung
- 5 x = unspezifisch
- A,B = ein bestimmtes DNA-Fragment betreffend
- ⊥ = immobilisiertes Oligonucleotid, ohne Primerfunktion
- = immobilisierter Primer
- F = DNA-Fragment
- 10 S = Einzelstrang eines DNA-Fragments
- +/- = einen codierenden / nicht codierenden Strang betreffend

Patentansprüche

1. Verfahren zur PCR-Amplifikation und Detektion von N
otidsequenzen,
5 mit folgenden Verfahrensschritten:
 - a) es wird ein Array von mehreren Analysepositionen bi
den Microspots verwendet, wobei die Microspots weni
tens ein immobilisiertes, mit einer zu identifizier
Zielsequenz eines DNA-Fragments hybridisierbares Ol
10 nucleotid als Sondenmolekül enthalten,
 - b) eine PCR-Reagenzien und mehrere Zielsequenzen entha
de Analytlösung wird so auf die Microspots aufgebra
dass sie das Array vollständig überdeckt,
 - c) zur Amplifikation der Zielsequenzen wird das Array
15 Thermozyklisierung unterworfen,
 - d) Hybridisierungsergebnisse an immobilisierten Sonden
külen einer Analyseposition werden mit Hilfe von Mi
elektrodenanordnung detektiert.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, da
eine hydrophile Reaktionsschicht (14) mit Kopplungsgrupp
zur kovalenten Bindung von Sondenmolekülen verwendet wird
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, da
25 als Reaktionsschicht (14) ein Hydrogel verwendet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeich
dass ein radikalisch vernetzbares Hydrogel auf Acrylamid
mit Maleinsäureanhydrid und/oder Glycidyl(meth)acrylat a
30 Kopplungsgruppen verwendet wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch ge
kennzeichnet, dass ein ein Bio-Chip, der eine Halbleiter
schicht und eine damit verbundene Isolierschicht (13) um
35 fasst, verwendet wird, wobei letztere auf ihrer der Halb

terschicht abgewandten Seite die Elektrodenanordnung (5) und die Reaktionsschicht (14) trägt.

5 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Halbleiterschicht eine Siliziumschicht (12) verwendet wird.

10 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass eine Analytlösung verwendet wird, die ein externes, d.h. außerhalb einer Zielsequenz mit einer Ziel-DNA hybridisierendes Primerpaar enthält.

15 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass eine Analytlösung verwendet wird, die mehrere DNA-Fragmente mit unterschiedlicher Zielsequenz und ein einziges zur Amplifikation sämtlicher Zielsequenzen geeignetes externes Primerpaar enthält.

20 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass eine Analytlösung verwendet wird, die einen mit dem einen Strang wenigstens eines DNA-Fragments zusammenwirkenden externen Primer enthält, und dass die Elongation eines Gegenstrangs innerhalb einer Reaktionsschicht mit Hilfe eines dort immobilisierten internen, d.h. mit der Zielsequenz spezifisch hybridisierenden Primers erfolgt.

30 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass eine Analytlösung verwendet wird, in der ein mit einer Zielsequenz spezifisch hybridisierendes internes Primerpaar in einem Microspot immobilisiert ist.

35 11. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 oder einem der Ansprüche 2 bis 10, enthaltend einen Bio-Chip mit einem Array von Analysepositionen bildenden Microspots (4), die von einer hydrophilen Reaktionsschicht (14) abgedeckt sind.

19

12. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Bio-Chip mit hydrophiler Reaktionsschicht (14) in einem Gehäuse mit Durchfluss für eine Analytlösung (18) angeordnet ist.

5

13. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Bio-Chip als Substrat (2) Träger für die Mikrospots (4) enthält.

10

14. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat (2) aus einem Halbleitermaterial, insbesondere Silizium (Si), auf dem eine Isolierschicht (13) aufgebracht ist, besteht.

15

15. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Bio-Chip ein vorgefertigter Silizium-Chip mit darin implementierten Dünnschicht-Mikroelektroden (6a, 7a; 24, 25) ist.

20

FIG 1

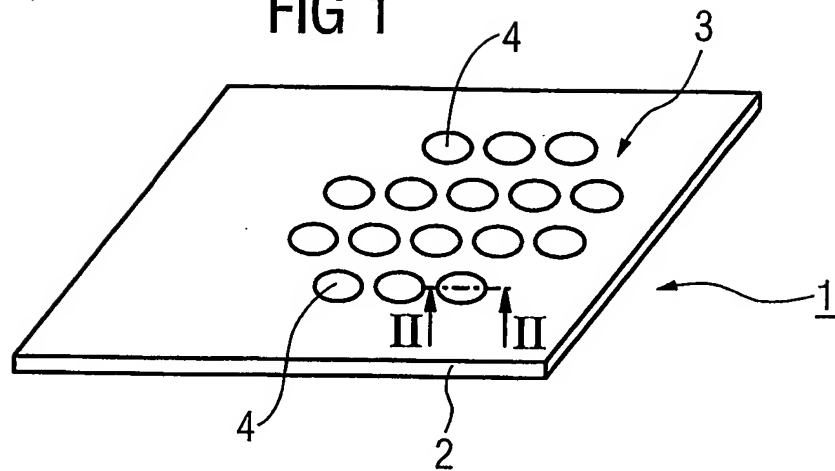


FIG 2

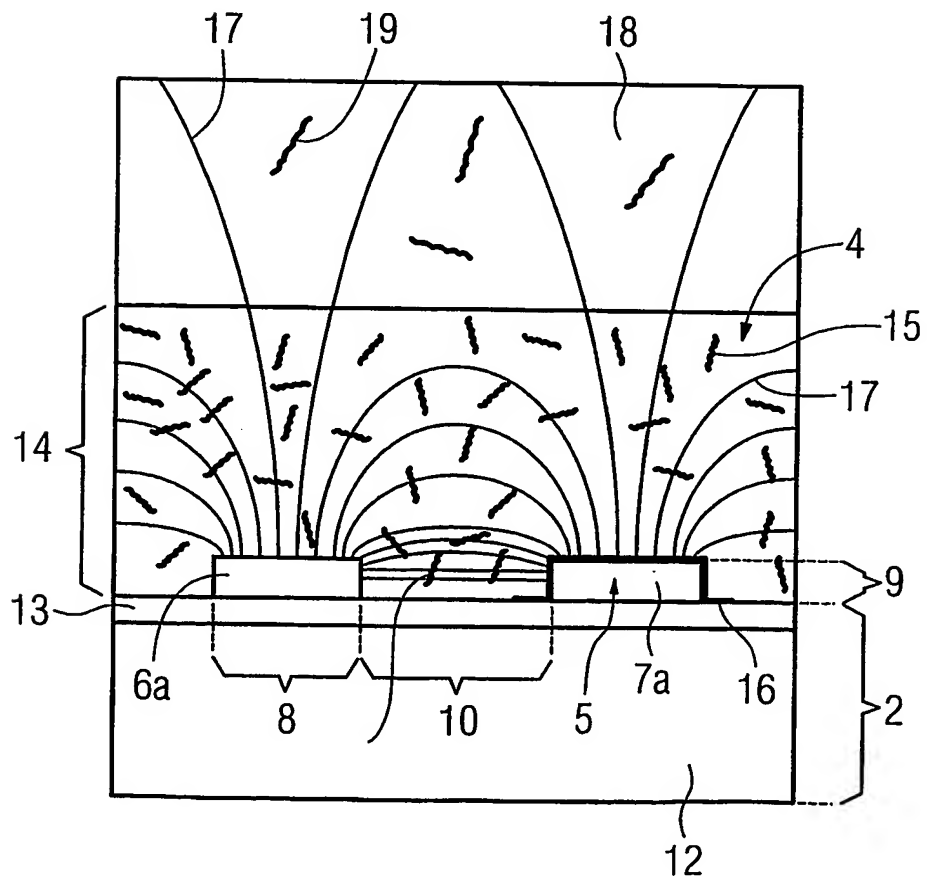


FIG 3

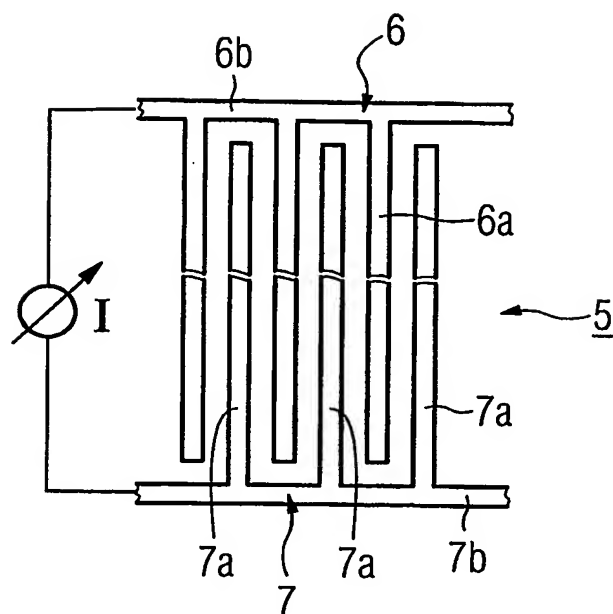


FIG 4

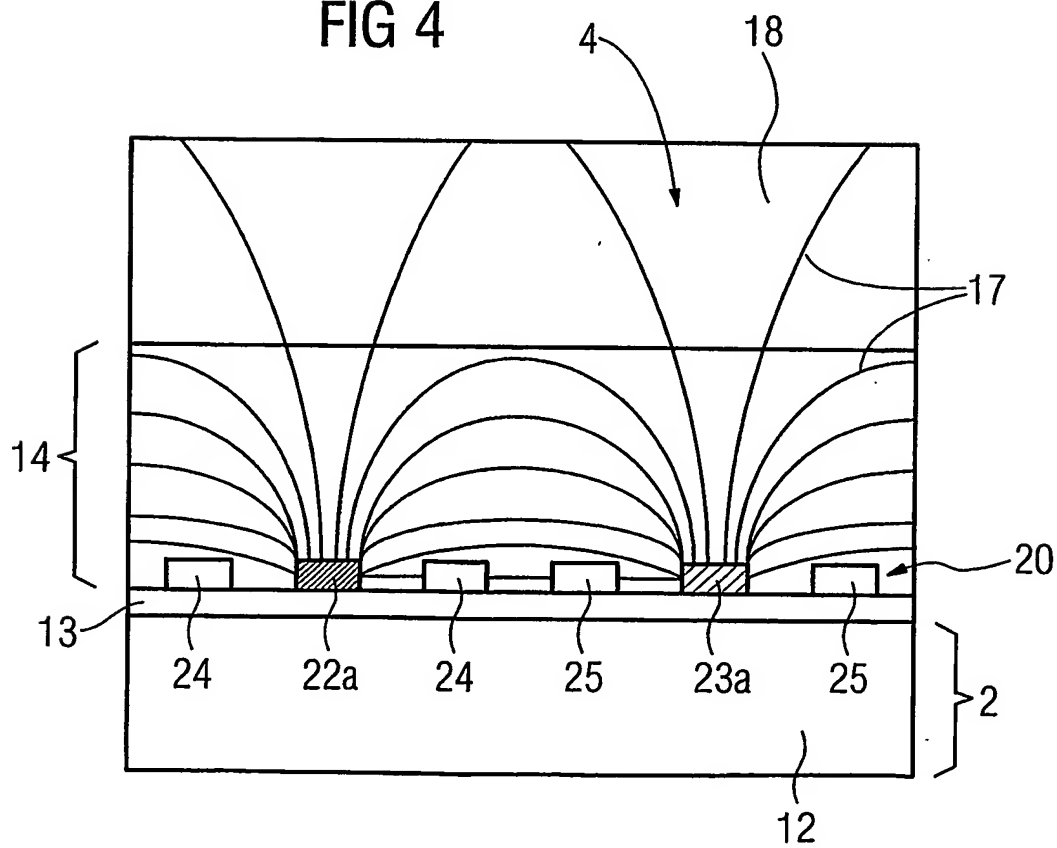


FIG 5

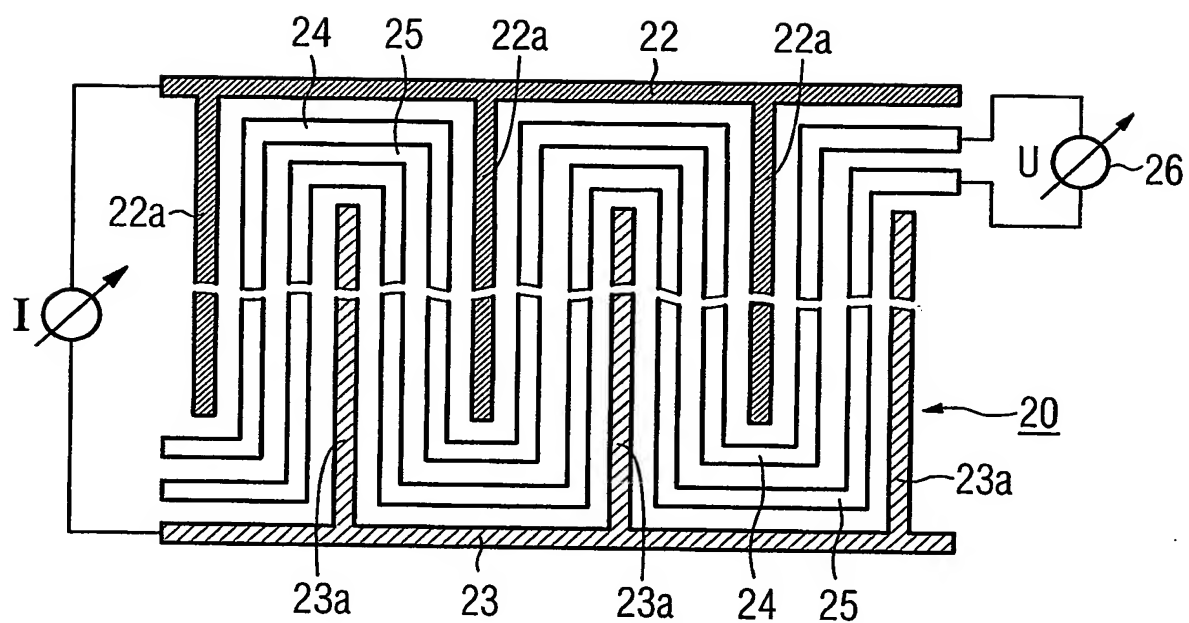


FIG 6

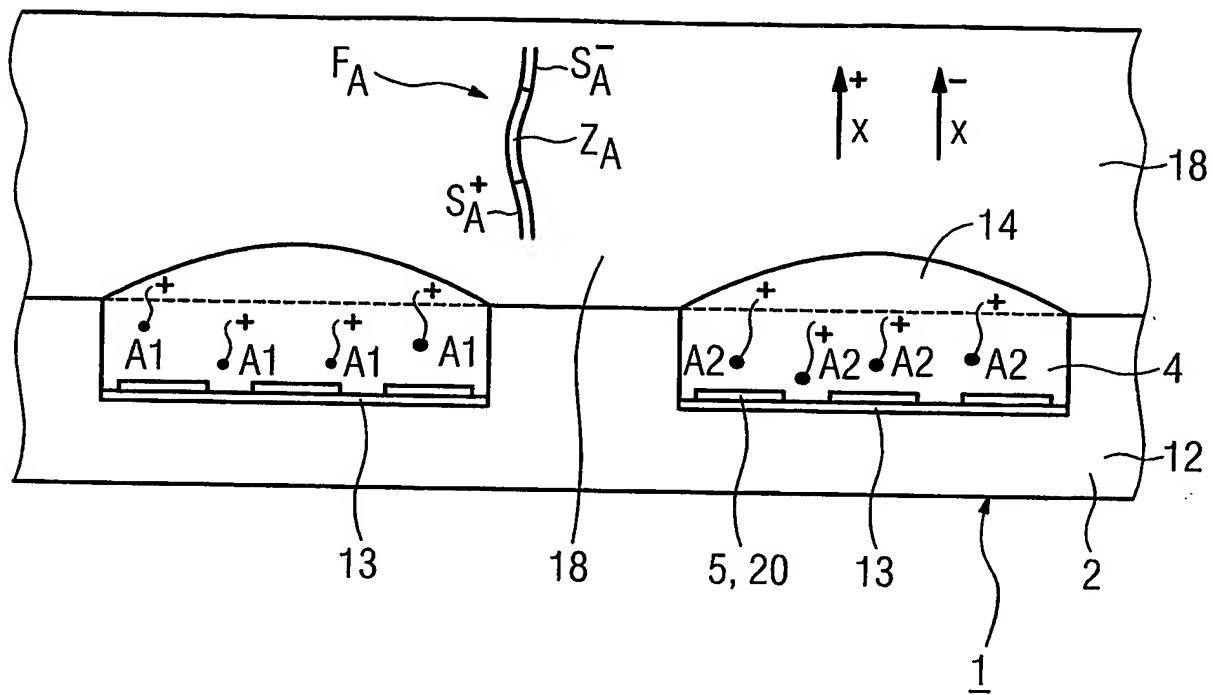


FIG 7

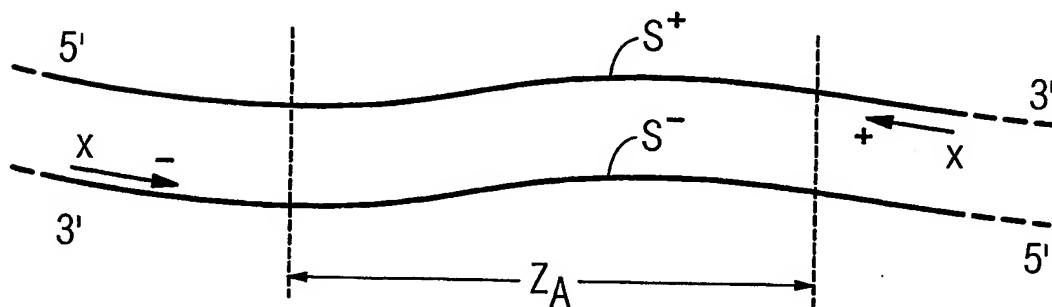


FIG 8

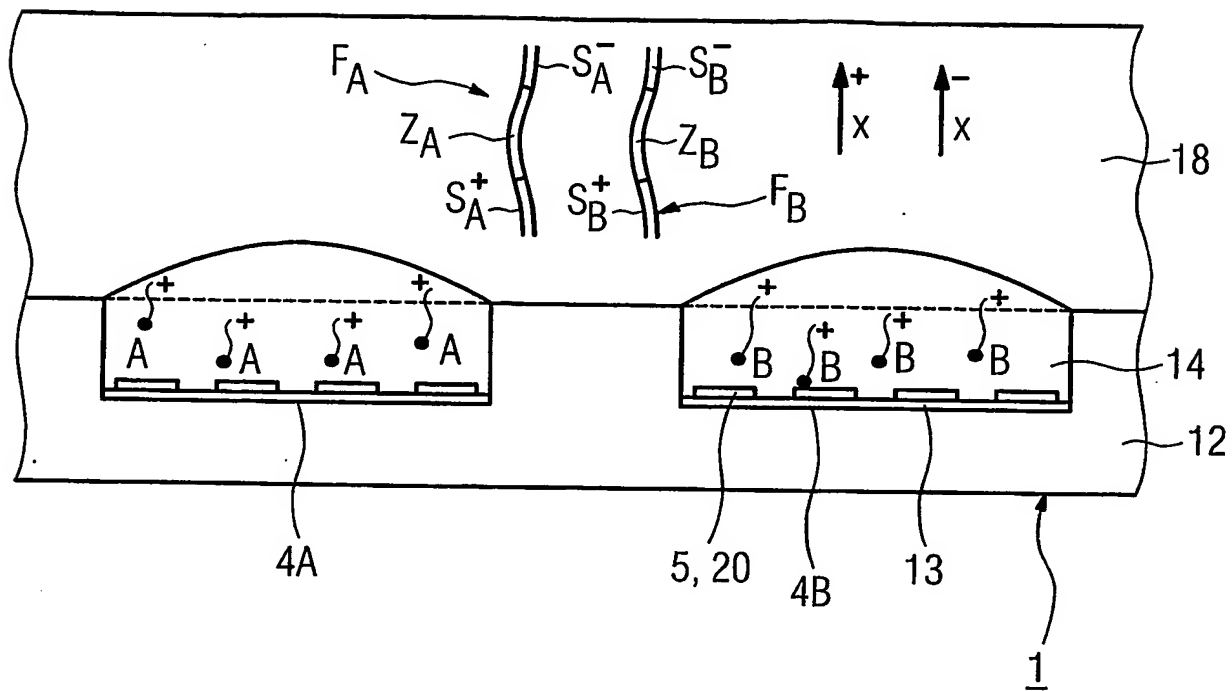


FIG 9

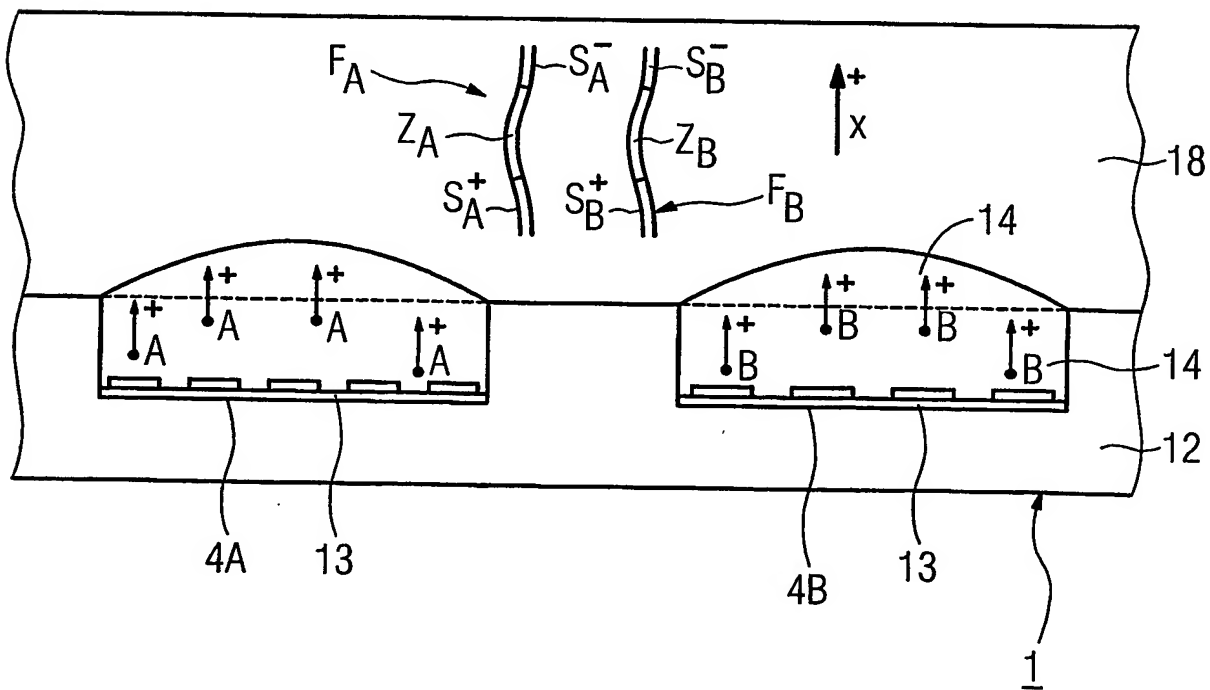
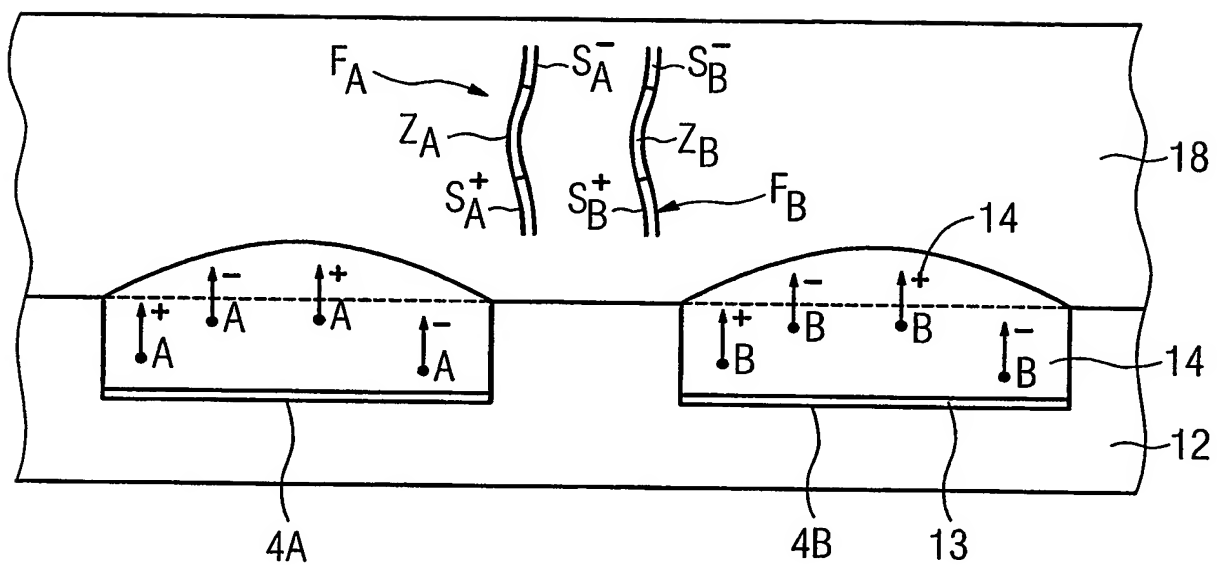


FIG 10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 03/04136

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, INSPEC, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/62036 A (NERENBERG MICHAEL I; EDMAN CARL F (US); WALKER GEORGE T (US); NANO) 19 October 2000 (2000-10-19)	1-3
Y	page 13, line 20 -page 26, line 15; claims 1-47; figures 1,2,12-15,22,23	4,7-10, 12,15
X	WO 00/60919 A (FENG LANA L; LANDIS GEOFFREY C (US); NERENBERG MICHAEL I (US); EDM) 19 October 2000 (2000-10-19)	1-3
Y	claims 1-32	4-15
X	US 6 258 606 B1 (KOVACS GREGORY T A) 10 July 2001 (2001-07-10)	1,5,6
Y	the whole document	12,15
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 May 2004

Date of mailing of the international search report

03/06/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stachowiak, O

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 03/04136

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/58522 A (CHANOCK STEPHEN J; NANOGEN INC (US); GILES PATRICK N (US); WU DAVI) 5 October 2000 (2000-10-05) page 2, line 15 -page 5, line 20; claims 1-9	1-3, 11, 13, 14
X	FUCHS A ET AL: "A SILICON LAB-ON-CHIP FOR INTEGRATED SAMPLE PREPARATION BY PCR AND DNA ANALYSIS BY HYBRIDIZATION" ANNUAL INTERNATIONAL IEEE-EMBS SPECIAL TOPIC CONFERENCE ON MICROTCHNOLOGIES IN MEDICINE AND BIOLOGY. PROCEEDINGS, XX, XX, 2 May 2002 (2002-05-02), pages 227-231, XP001180969 abstract; figures 1-4	1-3, 11, 13, 14
X	US 5 736 257 A (CHARLES JR PAUL T ET AL) 7 April 1998 (1998-04-07) claims 1-7	11, 13, 14
Y		4-6, 11, 13, 14
Y	WO 02/20833 A (BIOCHIP TECHNOLOGIES GMBH; SCHNEIDER STEPHAN (DE); ZELTZ PATRIC (D) 14 March 2002 (2002-03-14) the whole document	7-10
A	HODKO D ET AL: "DETECTION OF PATHOGENS USING ON-CHIP ELECTROCHEMICAL ANALYSIS OF PCR AMPLIFIED DNA MOLECULES" PROCEEDINGS OF THE SPIE, SPIE, BELLINGHAM, VA, US, vol. 4265, 25 January 2001 (2001-01-25), pages 65-74, XP008000573 ISSN: 0277-786X page 72, paragraph 1 -page 73, last paragraph; figure 1	1-15
A	SOSNOWSKI R G ET AL: "RAPID DETERMINATION OF SINGLE BASE MISMATCH MUTATIONS IN DNA HYBRIDS BY DIRECT ELECTRIC FIELD CONTROL" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 94, February 1997 (1997-02), pages 1119-1123, XP000857636 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-15
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 03/04136

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
------------	--	-----------------------

A

GILLES P N ET AL: "SINGLE NUCLEOTIDE
POLYMORPHIC DISCRIMINATION BY AN
ELECTRONIC DOT BLOT ASSAY ON SEMICONDUCTOR
MICROCHIPS"
NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING,
US,
vol. 17, April 1999 (1999-04), pages
365-370, XP002928935
ISSN: 1087-0156
page 365-367; figure 1

1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 03/04136

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0062036	A	19-10-2000	CA 2369016 A1	19-10-2000
			EP 1177423 A1	06-02-2002
			JP 2002541475 T	03-12-2002
			WO 0062036 A1	19-10-2000
			US 2003104430 A1	05-06-2003
WO 0060919	A	19-10-2000	US 6531302 B1	11-03-2003
			CA 2369148 A1	19-10-2000
			EP 1192720 A2	03-04-2002
			JP 2003510012 T	18-03-2003
			WO 0060919 A2	19-10-2000
			US 2003219804 A1	27-11-2003
US 6258606	B1	10-07-2001	US 5965452 A	12-10-1999
			US 2002131899 A1	19-09-2002
			US 2002127733 A1	12-09-2002
			US 2002029971 A1	14-03-2002
			AU 722148 B2	20-07-2000
			AU 3717697 A	02-02-1998
			BR 9710271 A	10-08-1999
			CA 2259406 A1	15-01-1998
			CN 1255197 A	31-05-2000
			EP 0920624 A1	09-06-1999
			JP 2001525921 T	11-12-2001
			KR 2000023659 A	25-04-2000
			NZ 333947 A	24-11-2000
			WO 9801758 A1	15-01-1998
			US 6225059 B1	01-05-2001
			US 6254827 B1	03-07-2001
WO 0058522	A	05-10-2000	AU 4058500 A	16-10-2000
			CA 2372909 A1	05-10-2000
			CN 1313906 T	19-09-2001
			EP 1088101 A1	04-04-2001
			JP 2004500020 T	08-01-2004
			WO 0058522 A1	05-10-2000
			US 2004058317 A1	25-03-2004
US 5736257	A	07-04-1998	WO 9633971 A1	31-10-1996
			US 5847019 A	08-12-1998
WO 0220833	A	14-03-2002	EP 1186669 A1	13-03-2002
			AU 8771201 A	22-03-2002
			WO 0220833 A2	14-03-2002
			JP 2004508053 T	18-03-2004
			US 2004048270 A1	11-03-2004

PCT/DE 03/04136

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

Recherchlärter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, INSPEC, MEDLINE, EMBASE

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00/62036 A (NERENBERG MICHAEL I; EDMAN CARL F (US); WALKER GEORGE T (US); NANO) 19. Oktober 2000 (2000-10-19)	1-3
Y	Seite 13, Zeile 20 -Seite 26, Zeile 15; Ansprüche 1-47; Abbildungen 1,2,12-15,22,23	4,7-10, 12,15
X	WO 00/60919 A (FENG LANA L; LANDIS GEOFFREY C (US); NERENBERG MICHAEL I (US); EDM) 19. Oktober 2000 (2000-10-19)	1-3
Y	Ansprüche 1-32	4-15
X	US 6 258 606 B1 (KOVACS GREGORY T A) 10. Juli 2001 (2001-07-10)	1,5,6
Y	das ganze Dokument	12,15
	-/--	

X Siehe Anhang Patentfamilie

- '&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

03/06/2004

Bevollmächtigter Bediensteter

Stachowiak, 0

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/04136

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00/58522 A (CHANOCK STEPHEN J; NANOGEN INC (US); GILES PATRICK N (US); WU DAVI) 5. Oktober 2000 (2000-10-05) Seite 2, Zeile 15 -Seite 5, Zeile 20; Ansprüche 1-9	1-3,11, 13,14
X	----- FUCHS A ET AL: "A SILICON LAB-ON-CHIP FOR INTEGRATED SAMPLE PREPARATION BY PCR AND DNA ANALYSIS BY HYBRIDIZATION" ANNUAL INTERNATIONAL IEEE-EMBS SPECIAL TOPIC CONFERENCE ON MICROTECHNOLOGIES IN MEDICINE AND BIOLOGY. PROCEEDINGS, XX, XX, 2. Mai 2002 (2002-05-02), Seiten 227-231, XP001180969 Zusammenfassung; Abbildungen 1-4	1-3,11, 13,14
X	US 5 736 257 A (CHARLES JR PAUL T ET AL) 7. April 1998 (1998-04-07)	11,13,14
Y	Ansprüche 1-7	4-6,11, 13,14
Y	----- WO 02/20833 A (BIOCHIP TECHNOLOGIES GMBH; SCHNEIDER STEPHAN (DE); ZELTZ PATRIC (D) 14. März 2002 (2002-03-14) das ganze Dokument	7-10
A	----- HODKO D ET AL: "DETECTION OF PATHOGENS USING ON-CHIP ELECTROCHEMICAL ANALYSIS OF PCR AMPLIFIED DNA MOLECULES" PROCEEDINGS OF THE SPIE, SPIE, BELLINGHAM, VA, US, Bd. 4265, 25. Januar 2001 (2001-01-25), Seiten 65-74, XP008000573 ISSN: 0277-786X Seite 72, Absatz 1 -Seite 73, letzter Absatz; Abbildung 1	1-15
A	----- SOSNOWSKI R G ET AL: "RAPID DETERMINATION OF SINGLE BASE MISMATCH MUTATIONS IN DNA HYBRIDS BY DIRECT ELECTRIC FIELD CONTROL" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 94, Februar 1997 (1997-02), Seiten 1119-1123, XP000857636 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument	1-15
	----- -/-	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/04136

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>GILLES P N ET AL: "SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHIC DISCRIMINATION BY AN ELECTRONIC DOT BLOT ASSAY ON SEMICONDUCTOR MICROCHIPS" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, Bd. 17, April 1999 (1999-04), Seiten 365-370, XP002928935 ISSN: 1087-0156 Seite 365-367; Abbildung 1 -----</p>	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/04136

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Im der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0062036	A	19-10-2000	CA 2369016 A1 19-10-2000 EP 1177423 A1 06-02-2002 JP 2002541475 T 03-12-2002 WO 0062036 A1 19-10-2000 US 2003104430 A1 05-06-2003
WO 0060919	A	19-10-2000	US 6531302 B1 11-03-2003 CA 2369148 A1 19-10-2000 EP 1192720 A2 03-04-2002 JP 2003510012 T 18-03-2003 WO 0060919 A2 19-10-2000 US 2003219804 A1 27-11-2003
US 6258606	B1	10-07-2001	US 5965452 A 12-10-1999 US 2002131899 A1 19-09-2002 US 2002127733 A1 12-09-2002 US 2002029971 A1 14-03-2002 AU 722148 B2 20-07-2000 AU 3717697 A 02-02-1998 BR 9710271 A 10-08-1999 CA 2259406 A1 15-01-1998 CN 1255197 A 31-05-2000 EP 0920624 A1 09-06-1999 JP 2001525921 T 11-12-2001 KR 2000023659 A 25-04-2000 NZ 333947 A 24-11-2000 WO 9801758 A1 15-01-1998 US 6225059 B1 01-05-2001 US 6254827 B1 03-07-2001
WO 0058522	A	05-10-2000	AU 4058500 A 16-10-2000 CA 2372909 A1 05-10-2000 CN 1313906 T 19-09-2001 EP 1088101 A1 04-04-2001 JP 2004500020 T 08-01-2004 WO 0058522 A1 05-10-2000 US 2004058317 A1 25-03-2004
US 5736257	A	07-04-1998	WO 9633971 A1 31-10-1996 US 5847019 A 08-12-1998
WO 0220833	A	14-03-2002	EP 1186669 A1 13-03-2002 AU 8771201 A 22-03-2002 WO 0220833 A2 14-03-2002 JP 2004508053 T 18-03-2004 US 2004048270 A1 11-03-2004

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.